

اثر نانولوله‌های کربنی چند دیواره بر صفات فیزیولوژیکی، ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه مریم‌گلی ایرانی (*Salvia mirzayanii*) تحت تنش خشکی

الهه چگینی^۱، منصور قربانپور^{۲*}، مهرناز حاتمی^۲، مینا تقی‌زاده^۳

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
 - ۲- گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
 - ۳- گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
- *آدرس مکاتبه: اراک، دانشگاه اراک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه گیاهان دارویی
پست الکترونیک: m_ghorbanpour@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۹۵/۱۰/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۳

چکیده

مقدمه: تنش‌های محیطی و محرک‌های زیستی و غیرزیستی از طریق فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی گیاهان باعث تولید متابولیت‌های ثانوی و القای پاسخ‌های فوق حساسیتی می‌شوند.

هدف: این مطالعه با هدف بررسی اثرات سطوح مختلف تنش خشکی و نانولوله‌های کربنی چند دیواره بر تغییرات فیزیولوژیکی و محتوای فلاونوئید، ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه مریم‌گلی ایرانی انجام شد.

روش بررسی: این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در شرایط گلخانه انجام شد. فاکتور اول تنش خشکی در ۴ سطح (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای) و فاکتور دوم محلول پاشی با نانولوله‌های کربنی چند دیواره (عاملدار و غیرعاملدار) در ۴ سطح (۰، ۵۰، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بود.

نتایج: نتایج نشان داد که تنش خشکی، نانولوله‌های کربنی چند دیواره و اثر متقابل آنها تأثیر معنی‌داری بر برخی صفات مورد مطالعه داشتند. به طوری که اثر تنش خشکی بر محتوای نسبی آب برگ ($P < 0/01$) و شاخص کلروفیل ($P < 0/05$) معنی‌دار شد، اما اثر نانولوله‌های کربنی بر شاخص نشت الکترولیت‌های سلول معنی‌دار ($P < 0/01$) بود. همچنین، اثر متقابل تیمارهای آزمایشی بر میزان فنل کل معنی‌دار ($P < 0/01$) شد. لیکن، بیشترین و کمترین مقدار ترکیبات فنلی به ترتیب در تیمار نانولوله‌های کربنی چند دیواره عاملدار با غلظت ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر تحت تنش خشکی ۲۵ درصد ظرفیت زراعی به دست آمد.

نتیجه‌گیری: استفاده از نانولوله‌های کربنی چند دیواره عاملدار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به همراه تنش خشکی ۵۰ درصد ظرفیت زراعی شاخص‌های فیزیولوژیکی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه را بهبود بخشید.

کل‌واژگان: مریم‌گلی ایرانی، تنش کم آبی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل کل، محتوای نسبی آب برگ، نانولوله‌های کربنی



مقدمه

گیاه مریم‌گلی ایرانی (*Salvia mirzayanii* Rech.f.& Esfand)، یک گیاه علفی دوساله یا چندساله، گلدار و خودرو است که متعلق به جنس *Salvia* و خانواده نعنا (*Lamiaceae*) می‌باشد. این گیاه بومی ایران بوده و در قسمت‌های جنوبی کشور بویژه استان هرمزگان رشد می‌کند [۱]، و به واسطه اثرات درمانی و مصارف بسیار زیادش از دیرباز مورد توجه اهالی بومی این استان بوده و از برگ آن جهت درمان ناراحتی‌های گوارشی، اسهال، استفراغ، مسمومیت، درد مفاصل، سردرد، التیام زخم، کاهش چربی و قند خون استفاده می‌شود [۱]. در اسانس برگ این گیاه ۸۱ ترکیب شناسایی شده است که دلتا-کادینن، لینالول، آلفا-تریپنیل استات، آلفا-کادینول و اسپاتولنول به عنوان ترکیبات اصلی اسانس گزارش شدند [۲]. ترکیبات فلاونوئیدی از قبیل اپی‌ژنین، اسکوتلارین، لوتولین و هیدروکسی لوتولین در اندام‌های هوایی این گیاه نیز شناسایی و گزارش شده است [۳]. مطالعات زیادی درباره خصوصیات آنتی‌باکتریال، آنتی‌اکسیدانی و محافظت از سیستم عصبی، در این گیاه انجام شده است.

هر چند عوامل محیطی و استفاده از بیستورها یا محرک‌های تولید متابولیت‌های ثانویه روش مناسبی برای افزایش سطح تولید این ترکیبات در گیاهان است، اما مطالعه‌ای که اثرات عوامل اکولوژیکی و بیستورها را در این گیاه بررسی کند، گزارش نشده است.

خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که مورفولوژی، فیزیولوژی و بیوشیمی گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. طی سال‌های اخیر، کاربرد نانو مواد مهندسی شده به عنوان یکی از راهکارهای نوین در مقابل اثرات مخرب تنش خشکی در گیاهان نتایج امیدوارکننده‌ای داشته است. در یک مطالعه حاتمی و همکاران (۲۰۱۷) اثر غلظت‌های مختلف نانو لوله‌های کربنی تک دیواره (SWCNTs) را در شرایط تنش خشکی بر جنبه‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی بذرالبنج (*Hyoscyamus niger* L.) بررسی و گزارش کردند که استفاده از غلظت‌های کم نانو لوله‌های کربنی باعث کاهش معنی‌دار آسیب‌های ناشی از تنش خشکی (تا سطح متوسط) بر

گیاه می‌شود [۴]. همچنین، گزارش شده است که استفاده از نانو ذرات نقره در گیاه زنیان (*Carum copticum* L.) هیچ گونه تأثیری روی صفات عملکرد و کارایی مصرف آب در شرایط تنش خشکی ندارد [۵]. علاوه بر این، گزارش شده است که نانو ذرات از طریق چسبیدن به سلول‌های ریشه باعث خسارت فیزیکی و مسدود شدن حفره‌ها و کاهش هدایت هیدرولیکی و جذب آب می‌شوند [۶].

کمبود آب همانند سایر شرایط فوق‌العاده محیطی، تنش اکسیداتیو در سلول گیاهان ایجاد می‌کند [۷]، و از طریق بسته شدن روزنه و در نتیجه کمبود دی‌اکسید کربن، باعث توقف فتوسنتز و منجر به تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive oxygen species) (ROS) در کلروپلاست می‌شود که در نتیجه باعث آسیب به غشا در اثر فرآیند پراکسیداسیون لیپید می‌شود [۸]. با توجه به این‌که آب بستری مناسب برای انجام متابولیسم در گیاهان است، بنابراین پاسخ گیاهان به خشکی می‌تواند از طریق تعدیل ساختمان یا متابولیسم در مواجهه با تغییرات محیطی باشد [۹]. اندازه‌گیری برخی روش‌ها که به طور مستقیم و غیرمستقیم به کمبود آب ارتباط دارند مانند شاخص کلروفیل (Soil Plant Analysis Development) (SPAD)، محتوای نسبی آب (Relative Water Content) (RWC)، نشت الکترولیت (Electrolyte Leakage) (EL)، همگی به عنوان معیارهایی جهت انتخاب ژنوتیپ‌های دارای پتانسیل تحمل به خشکی در گیاهان محسوب می‌شوند [۱۰].

یافته‌های محققان حاکی از آن است که نانو ذرات، هم اثر مثبت و هم اثر منفی روی رشد و نمو گیاهان دارند و این تأثیر در گیاهان بستگی به ترکیب، غلظت، اندازه، و خواص فیزیکی و شیمیایی نانو ذرات و همچنین گونه گیاهی، مرحله رشدی گیاه، روش و مدت زمان قرار گرفتن در معرض آنها دارد [۱۱-۱۴]. همچنین، نانو مواد می‌توانند به عنوان ترکیبات سیگنال برای واکنش‌های متابولیکی و فیزیولوژیکی عمل کنند اما اساس مکانیسم آنها به طور کامل مشخص نشده است [۱۵]. انواع مختلف نانو مواد اعم از نانو مواد فلزی و نانو مواد بر پایه کربنی قادر به ایجاد تنش در گیاهان هستند، اما اثرات مثبت



۲۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر و وزن خالی ۲۵۰ گرم انتخاب شدند. کف گلدان تا ارتفاع ۴ سانتی‌متر شن درشت برای زهکشی مناسب ریخته شد و به میزان ۷ کیلوگرم از خاک مورد نظر (خاک مزرعه و شن به نسبت ۲ به ۱) پر شد. خاک برای کشت از نظر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مورد آنالیز قرار گرفت (جدول شماره ۱).

بذرها به دلیل موسیلاژی بودن در داخل پتری دیش (به قطر ۱۰ سانتی‌متر) و شرایط کنترل شده (درجه حرارت: 22 ± 2 سانتی‌گراد، رطوبت نسبی: ۷۰ درصد، ۱۶/۸ ساعت تاریکی/روشنایی) جوانه‌دار شدند. سپس ۱۴ روز پس از جوانه‌زنی، بذرهای جوانه‌دار شده یا به عبارت دیگر گیاهچه‌های سالم و کاملاً یکنواخت (به ارتفاع ۵ سانتی‌متر) به گلدان‌های آزمایشی فوق‌الذکر منتقل شدند. تمامی مراحل داشت از قبیل آبیاری، حذف علف‌های هرز (وجین) و غیره در این مدت به طور مرتب و یکنواخت انجام گرفت و اجازه داده شد گیاهچه‌ها به اندازه کافی رشد کنند. به دلیل اینکه گیاه مریم‌گلی ایرانی گیاهی دوساله است برای وارد شدن به فاز گلدهی نیاز به سرمادهی دارد، به این منظور گیاهان ۷۵ روز پس از کاشت در گلدان‌ها به بیرون از گلخانه منتقل شدند. پس از زمستان‌گذرانی و با شروع فصل بهار (۱۵۵ روز پس از کاشت) گلدان‌های حاوی گیاه دوباره به گلخانه منتقل شدند و با مشاهده اولین نشانه‌های ظهور ساقه گلدهنده، تیمارهای خشکی و محلول‌پاشی نانولوله‌های کربنی چند دیواره صورت گرفت. برای اطمینان بیشتر قبل از اعمال تیمار خشکی گلدان‌ها دوباره وزن شدند. اعمال تنش خشکی با شروع مرحله ساقه‌دهی و تا انتهای مرحله گلدهی بر اساس ظرفیت زراعی (FC) به صورت وزنی انجام شد. تنش خشکی در ۴ سطح ۱۰۰، ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد FC در نظر گرفته شد. میزان رطوبت FC با استفاده از دستگاه صفحه فشاری (Pressure Plate Apparatus) تعیین شد (۱۲/۴ درصد). برای اعمال تیمار تنش خشکی، ابتدا وزن گلدان‌ها در حد رطوبت ظرفیت مزرعه و همچنین سطوح مختلف مصرف آب قابل استفاده خاک محاسبه و بعد تمام گلدان‌ها با آب مقطر آبیاری شدند تا به حد رطوبت ظرفیت مزرعه‌ای رسیدند.

نانولوله‌های کربنی در سیستم‌های زیستی و گیاهی بیشتر گزارش شده است. به طوری که نانو لوله‌های کربنی در تنظیم رشد گیاهان زینتی و گیاهان مورد استفاده در سوخت‌های زیستی، همچنین گیاهانی که به طور خاص برای استخراج متابولیت‌ها و پروتئین‌ها تولید می‌شوند مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۶]. با این حال مطالعات اندکی در رابطه با اثرات نانوذرات بر بیوسنتز انواع مختلفی از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی انجام شده است. گزارش شده است که استفاده از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2) در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum L.*) تحت تنش خشکی اثرات منفی تنش را بهبود بخشید [۱۷]. کاربرد نانوذرات آهن در گلرنک (*Carthamus tinctorius L.*) تحت تنش کمبود آب موجب کاهش اثرات خشکی و همچنین بهبود عملکرد گلرنگ شد [۱۸]. همچنین، گزارش شده است که استفاده از نانوذرات TiO_2 در گیاه کتان (*Linum usitatissimum L.*) سبب افزایش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید، بهبود شاخص‌های رشد و عملکرد و کاهش محتوای H_2O_2 و مالون‌دی‌آلدئید تحت تنش خشکی می‌شود [۱۹]. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با اثر نانولوله‌های کربنی چند دیواره تحت شرایط تنش خشکی بر متابولیسم ثانویه گیاهان انجام نشده است و با توجه به اثرات مثبت نانولوله‌های کربنی در مطالعات محیطی، این پژوهش با هدف بررسی استفاده از نانولوله‌های کربنی چنددیواره عاملدار (عاملدار شده با $-\text{COOH}$) و غیرعاملدار با غلظت‌های مختلف تحت سطوح مختلف تنش خشکی بر تغییرات فیزیولوژیکی و محتوای فلاونوئید، ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه مریم‌گلی ایرانی انجام شد.

مواد و روش‌ها

کشت گلدانی و اعمال تیمارهای آزمایشی

این آزمایش در سال ۹۵-۱۳۹۴ در گلخانه گروه گیاهان دارویی دانشکده کشاورزی دانشگاه اراک اجرا شد. گیاه مورد مطالعه در این پژوهش گیاه مریم‌گلی ایرانی (*Salvia mirzayanii*) بود. گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه



جدول شماره ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

بافت خاک	شن (درصد)	سیلت (درصد)	رس (درصد)	کربن آلی (درصد)	هدایت الکتریکی (ds/m)
شنی لومی	۶۲	۲۰	۱۸	۱/۹	۰/۸
ظرفیت زراعی (درصد)	عصاره اشباع (درصد)	نیترژن کل (درصد)	کربنات کلسیم (درصد)	فسفات در دسترس (mg/kg)	پتاسیم در دسترس (mg/kg)
۱۲/۵	۲۸/۴	۰/۱۱	۷/۴	۸/۸۳	۲۴۵
pH	روی (mg/kg)	کلسیم (mg/kg)	منگنز (mg/kg)	آهن (mg/kg)	ظرفیت تبادل کاتیونی (Cmol/kg)
۷/۶	۰/۴۴	۱/۶۲	۱۰/۱	۱۱/۲	۱۰/۵

سپس برگ‌های فوق‌الذکر در آن ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شده و دوباره وزن شدند، بدین ترتیب محتوی نسبی آب برگ‌ها و از طریق رابطه ذیل محاسبه شد [۲۰].

$$RWC\% = \frac{FW - DW}{TW - DW} \times 100$$

که در آن FW وزن تر، DW وزن خشک و TW وزن آماس برگ می‌باشد.

اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها

از برگ گیاهان تحت تیمارهای مختلف به طور جداگانه دیسکت دایره‌ای به میزان یکسان تهیه شد. سپس نمونه‌ها در آب مقطر و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت هدایت الکتریکی هر نمونه با استفاده از EC متر مدل (Lutron) اندازه‌گیری شد (EC₁). به منظور اندازه‌گیری میزان کل نشت الکترولیت‌ها در اثر مرگ سلول‌ها، لوله‌های آزمایش در دستگاه بن‌ماری در دمای ۹۵ سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شدند و پس از سرد شدن لوله‌ها، مجدداً هدایت الکتریکی نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید (EC₂). سپس درصد نشت الکترولیت‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۲۱].

$$\text{نشت الکترولیت (درصد)} = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100$$

شاخص محتوای کلروفیل (قرائت SPAD)

مقدار نسبی سبزیگی یا کلروفیل برگ به صورت غیرمستقیم و بدون ایجاد تخریب در برگ‌ها، با استفاده از دستگاه SPAD یا کلروفیل‌متر (مدل: KONICAMINOLTA 502, Japan) تعیین شد.

نانولوله‌های کربنی چند دیواره (عاملدار و غیرعاملدار) در ۴ سطح ۰، ۵۰، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر (عاملدار) و ۵۰ پی‌پی‌ام (غیرعاملدار) بعد از دو روز از شروع تنش خشکی در دو مرحله (مرحله اول ۱۷۰ روز پس از کاشت و مرحله دوم ۱۸۵ روز پس از کاشت) با نصف کردن غلظت‌ها بر روی گیاهان محلول‌پاشی شدند. خصوصیات نانولوله‌های کربنی چند دیواره استفاده شده در این آزمایش که از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان یا نانو ثانی مشهد تهیه شد در جدول شماره ۲ و شکل‌های شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است. لازم به ذکر است که انتخاب غلظت‌های نانو لوله‌های کربنی بر اساس یک آزمایش مقدماتی انجام شد (داده‌ها نشان داده نشدند). جهت تهیه غلظت‌های مورد نظر، نانو لوله‌ها ابتدا با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به حالت سوسپانسیون درآمدند و بعد از اولتراسونیک (با قدرت ۴۰ وات) به مدت ۳۰ دقیقه جهت تشکیل محلولی یکنواخت و همگن به حجم رسیدند. بعد از گذشت سه هفته از اعمال تیمارها (۲۰۵ روز پس از کاشت) نمونه‌برداری‌ها برای اندازه‌گیری صفات مورد نظر انجام شد.

اندازه‌گیری محتوی نسبی آب (RWC)

به منظور اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ، در ساعت ۱۰ صبح از آخرین برگ کاملاً توسعه یافته گیاهان به طور تصادفی نمونه‌برداری انجام شد. بلافاصله بعد از نمونه‌برداری، وزن تر برگ‌ها با ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری شد. سپس برگ‌ها در آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق و نور کم برای محاسبه وزن اشباع، غوطه‌ور شدند و پس از این مدت نمونه‌ها به سرعت و با دقت با دستمال کاغذی خشک و وزن اشباع آنها اندازه‌گیری شد.



$$C \text{ (mg/g FW)} = [V/6 (A_{480}) + 1/49 (A_{510})] \times V/W$$

که در آن A_{480} ، A_{510} ، A_{645} ، A_{663} به ترتیب مقدار جذب قرائت شده در طول موج‌های ۴۸۰، ۵۱۰ نانومتر، V حجم نهایی استن مصرفی بر حسب میلی‌لیتر و FW وزن تازه برگ بر حسب میلی‌گرم می‌باشد.

تهیه عصاره الکلی

برای تهیه عصاره، ۰/۵ گرم پودر گیاه خشک شده را در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به عنوان حلال اضافه نموده و مخلوط حاصل برای ۱۲ ساعت توسط شیکر هم‌زده شد و بعد از صاف کردن توسط کاغذ صافی، عصاره حاصل در شیشه‌های غیرقابل نفوذ به هوا و نور، در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های گیاهی (کلروفیل و کاروتنوئید)

میزان کلروفیل و کاروتنوئید به روش آرنون تعیین شد [۲۲]. مطابق این روش، ۰/۵ گرم برگ تازه در داخل هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد سائیده شد. عصاره حاصل برای ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ rpm قرار داده شد. از محلول رویی مقدار سه میلی‌لیتر به داخل کووت اسپکتروفتومتر ریخته شد و مقدار جذب در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵، ۴۸۰ و ۵۱۰ نانومتر قرائت شد. از روابط زیر برای غلظت کلروفیل a ، کلروفیل b ، کل کلروفیل و کاروتنوئید استفاده شد:

$$\text{Chl } a \text{ (mg/g FW)} = [127 (A_{663}) - 2/69 (A_{645})] \times V/W$$

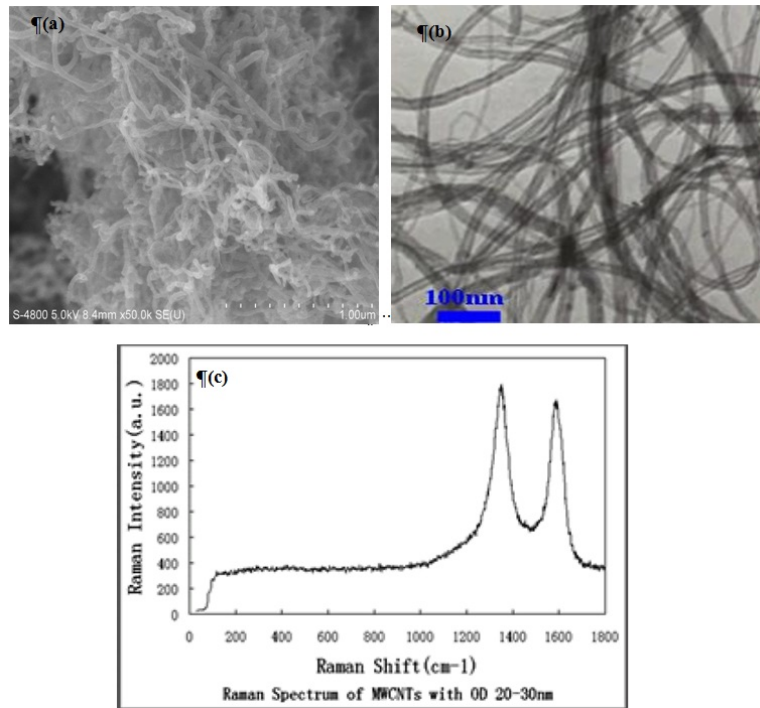
$$\text{Chl } b \text{ (mg/g FW)} = [22/9 (A_{645}) - 4/68 (A_{663})] \times V/W$$

$$\text{Chl total (mg/g FW)} = [20/2 (A_{645}) + 8/02 (A_{663})] \times V/W$$

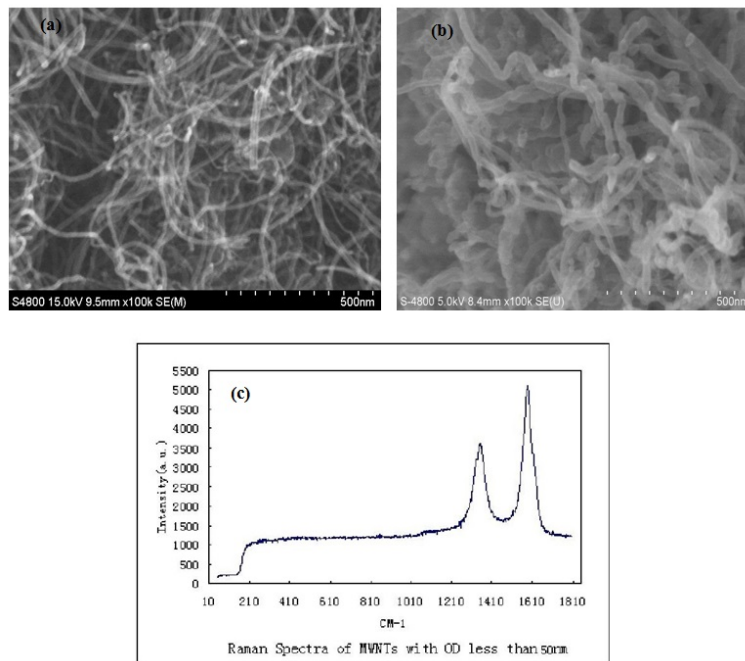
جدول شماره ۲- مشخصات نانولوله‌های کربنی چند دیواره‌ای و غیرعاملدار مورد استفاده در این آزمایش

ویژگی	نانولوله‌های کربنی چند دیواره‌ای عاملدار	نانولوله‌های کربنی چند دیواره‌ای غیر عاملدار
قطر بیرونی (نانو متر)	۲۰-۳۰	۲۰-۳۰
قطر داخلی (نانو متر)	۵-۱۰	۵-۱۰
خلوص (درصد)	>۹۹ وزنی (نانولوله‌های کربنی)	>۹۵ وزنی (نانولوله‌های کربنی)
مقدار -COOH (درصد)	>۹۸ وزنی (نانولوله‌های چند دیواره)	>۹۷ وزنی (نانولوله‌های چند دیواره)
طول (نانو متر)	۲/۷۳ وزنی	-
رنگ	۱۰-۳۰ سیاه	۱۰-۳۰ سیاه
سطح ویژه (متر مربع در گرم)	>۱۱۰	>۱۱۰
رسانای الکتریکی (زیمنس بر سانتی متر)	>۱۰۰	>۱۰۰
خاکستر (درصد)	<۱/۵	<۱/۵
چگالی انباشتگی (گرم در سانتی متر مکعب)	۰/۲۸	۰/۲۸
چگالی واقعی (گرم در سانتی متر مکعب)	~۲/۱	~۲/۱
ترکیبات		
کربن (درصد)	۹۸/۳۹	۹۷/۴۶
کلر (درصد)	۰/۴۵	۱/۰۲
آهن (درصد)	۰/۲۳	-
نیکل (درصد)	۰/۹۳	-
آلومینیوم (درصد)	-	۰/۱۹
کیالت (درصد)	-	۱/۰۹
گوگرد (درصد)	-	۰/۲۴





شکل شماره ۱- خصوصیات نانولوله‌های کربنی چند دیواره عاملدار (-COOH). (a) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، (b) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، (c) طیف رامان



شکل شماره ۲- خصوصیات نانولوله‌های کربنی چند دیواره غیرعاملدار. (a) تصویر SEM، (b) تصویر TEM، (c) طیف رامان



استفاده قرار گرفت. درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۲۵].

$$\text{درصد مهار رادیکال‌های آزاد (DPPH)} = \frac{(AC-As)}{AC} \times 100$$

در این فرمول AC جذب شاهد و As بیانگر جذب نوری غلظت‌های مختلف عصاره گیاه می‌باشد. پس از آن غلظتی از عصاره‌های گیاه که دارای درصد مهار رادیکالی ۵۰ درصد بود یا (IC_{50}) توسط نمودار محاسبه شد. بدیهی است که هر چه این عدد کوچک‌تر باشد، قدرت آنتی‌اکسیدانی یا مهار رادیکال‌های آزاد، بیشتر می‌باشد.

حلال‌ها و مواد آزمایش

حلال‌ها و مواد شیمیایی استفاده شده در آزمایش مزبور از شرکت سیگما تهیه شد و نانولوله‌های کربنی چند دیواره از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان (مشهد) خریداری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد. محاسبات آماری حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. همچنین برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel سری ۲۰۱۰ استفاده شد.

نتایج

صفات فیزیولوژیک

محتوای نسبی آب برگ: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات متقابل تنش خشکی و کاربرد نانولوله‌های کربنی چند دیواره بر محتوای نسبی آب برگ معنی‌دار نیست، اما تأثیر تنش خشکی بر این صفت در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول شماره ۳). کاهش مقادیر آبیاری و در نتیجه افزایش پتانسیل آبی موجب کاهش محتوای نسبی آب برگ‌ها شد به طوری که بیشترین و کمترین میزان نسبی آب برگ با میانگین‌های ۶۶/۰۹

تعیین مقدار فلاونوئید کل

از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم برای تعیین مقدار فلاونوئیدها استفاده شد [۲۳]. ۲ میلی‌لیتر از هر یک از عصاره‌های رقیق شده متانولی (۱:۵) با ۲ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۲ درصد داخل لوله آزمایش ترکیب شدند. و بعد از نگهداری نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه، جذب نمونه‌ها در ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. به منظور رسم منحنی استاندارد از کوئرتستین استفاده شد ($y=0.0215x+0.2403$, $R^2=0.9874$). نتایج بر حسب میلی‌گرم کوئرتستین در گرم عصاره بیان شد.

اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فنلی

جهت اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل از معرف Folin-Ciocalteu استفاده شد. به ۴۰۰ ماکرولیتراز عصاره رقیق شده (۱:۵) ۲ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو (۱:۱۰) اضافه شد، پس از ۵ دقیقه، ۱/۶ میلی‌لیتر از محلول ۷۵ گرم بر لیتر کربنات سدیم به آن اضافه شد. جذب مخلوط نیم ساعت بعد در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک قرائت شد. اسید گالیگ به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار رفت ($y=0.0186x-0.0051$, $R^2=0.9982$). نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیگ بر گرم عصاره بیان شد [۲۴].

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH

جهت تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی از رادیکال آزاد و پایدار DPPH استفاده شد. رادیکال پایدار دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل یا DPPH را به غلظت ۴ میلی‌گرم در ۱۰۰ سی‌سی متانول حل کرده و به این منظور از عصاره استخراج شده، ۵ رقت مختلف در متانول تهیه شد. به ۲ میلی‌لیتر از عصاره‌های رقیق شده ۲ میلی‌لیتر از محلول DPPH اضافه و مخلوط ورتکس شد و سپس در شرایط بدون نور به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک قرائت شد (دستگاه قبلاً با متانول ۸۰ درصد صفر شد). یک نمونه حاوی متانول و محلول DPPH به عنوان نمونه شاهد مورد



کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید نتایج به دست آمده نشان داد که اثرات متقابل و ساده تنش خشکی و نانولوله‌های کربنی چند دیواره بر این صفات دارای اختلاف معنی‌دار از نظر آماری نبودند (جدول شماره ۳).

میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی

نتایج نشان داد که اثر متقابل تنش خشکی و کاربرد نانولوله‌های کربنی چند دیواره بر میزان فنل کل در گیاه مریم‌گلی ایرانی دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد بود (جدول شماره ۴). بیشترین مقدار ترکیبات فنلی (۸/۷۶ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک) در تیمار نانولوله‌های کربنی چند دیواره عاملدار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و تنش خشکی ۲۵ درصد ظرفیت زراعی حاصل شد، در حالی که کم‌ترین مقدار ترکیبات فنلی (۲/۷۳ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک) در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌های عاملدار تحت تنش ۲۵ درصد ظرفیت زراعی به دست آمد (شکل شماره ۳).

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول شماره ۴)، محتوای فلاونوئید کل تحت شرایط تنش خشکی تغییرات معنی‌داری داشت ($P < 0/05$) به طوری که با افزایش سطح خشکی، افزایش معنی‌دار یافته و بیشترین میزان آن در تیمار ۵۰ درصد ظرفیت زراعی به دست آمد و با کاربرد نانولوله‌های

و ۴۰/۹۴ درصد به ترتیب در تیمارهای تیمار آبیاری بر اساس ۱۰۰ و ۲۵ درصد رطوبت ظرفیت زراعی خاک مشاهده شد. در سطوح مختلف کاربرد نانولوله‌های کربنی چند دیواره نیز بیشترین میزان نسبی آب برگ در تیمار شاهد (صفر) و کمترین میزان این فاکتور در تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌های کربنی چند دیواره غیرعاملدار حاصل شد.

نشت الکترولیت‌ها: نتایج نشان داد که اثر متقابل تنش خشکی و نانولوله‌ها و اثر ساده تنش خشکی بر این صفت معنی‌دار نمی‌باشد و نشت یونی فقط تحت تأثیر غلظت‌های مختلف از نانولوله‌های کربنی چند دیواره در سطح احتمال یک درصد تغییر کرده است (جدول شماره ۳). بالاترین میزان نشت الکترولیت (۸۱/۹۳ درصد) از تیمار شاهد به دست آمد که به طور معنی‌داری با کمترین میزان این صفت (۴۱/۳۶ درصد) که از تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌های کربنی چند دیواره عاملدار به دست آمد تفاوت داشت (جدول شماره ۵).

شاخص کلروفیل: اثر تنش خشکی بر شاخص کلروفیل (SPAD) برگ معنی‌دار بود اما اثر متقابل خشکی و کاربرد نانولوله‌های کربنی چند دیواره بر این صفت معنی‌دار نشد (جدول شماره ۳). با شروع تنش ابتدا این صفت کاهش و در سطوح بالاتر خشکی شاخص کلروفیل برگ افزایش یافت به طوری که بیشترین مقدار (۴۴/۱) شاخص کلروفیل مربوط به تنش ۲۵ درصد ظرفیت زراعی بود (جدول شماره ۵).

رنگیزه‌های فتوسنتزی: در رابطه با صفات کلروفیل a،

جدول شماره ۳- نتایج تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی گیاه مریم‌گلی ایرانی تحت تأثیر مقادیر مختلف نانولوله‌های کربنی چند دیواره و سطوح خشکی

منابع تغییر	درجه آزادی	محتوی نسبی آب	نشت یونی	شاخص کلروفیل	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید
نانولوله‌های کربنی	۳	۲۰۹/۳ ^{ns}	۲۵۳۷/۶۲ ^{**}	۱۶/۵۵ ^{ns}	۰/۰۰۶۳ ^{ns}	۰/۰۱۴ ^{ns}	۰/۰۳۵ ^{ns}	۰/۰۰۶ ^{ns}
تنش خشکی	۳	۹۰۹/۱۸ ^{**}	۳۲۹/۴۹ ^{ns}	۲۷/۱*	۰/۰۰۷۱ ^{ns}	۰/۰۰۲ ^{ns}	۰/۰۱۳ ^{ns}	۰/۰۰۶ ^{ns}
نانولوله‌ها × خشکی	۹	۷۴/۸۹ ^{ns}	۲۶۷/۱ ^{ns}	۸/۷۳ ^{ns}	۰/۰۱۸ ^{ns}	۰/۰۰۷ ^{ns}	۰/۰۴۷ ^{ns}	۰/۰۰۸ ^{ns}
اشتباه آزمایشی	۳۲	۸۲/۰۵	۱۸۴/۸۸	۶/۴۳	۰/۰۱	۰/۰۰۹	۰/۰۰۵	۰/۰۰۶
ضریب تغییرات (درصد) C.V		۱۷/۲۶	۲۲/۶۴	۶/۰۸	۲۵/۳۹	۴۲/۵۱	۲۹/۵۸	۱۸/۰۴

^{ns} و ^{**} به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد



جدول شماره ۴- نتایج تجزیه واریانس میانگین مربعات تأثیر نانولوله‌های کربنی چند دیواره و سطوح خشکی بر صفات متابولیتی گیاه مریم‌گلی ایرانی

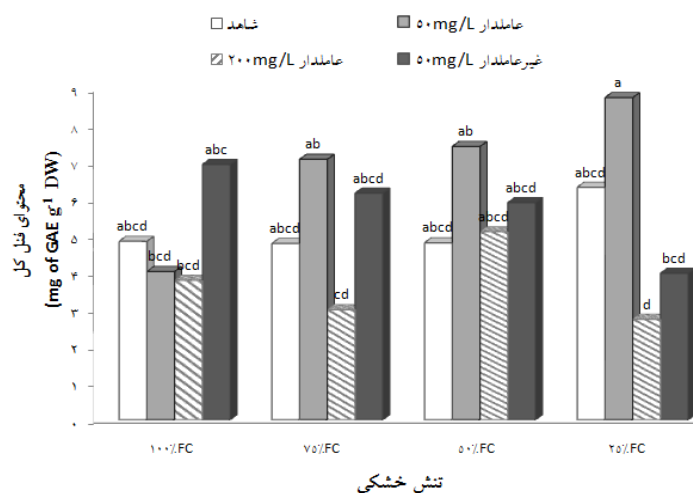
منابع تغییر	درجه آزادی	فنل کل	فلانونوئید کل	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی IC ₅₀
نانو لوله‌های کربنی	۳	۲۰/۹**	۱۲/۴**	۲۲۴/۱۳*
تنش خشکی	۳	۱/۷۳ ^{ns}	۳/۹۰*	۱۶/۴۳ ^{ns}
نانولوله‌ها × خشکی	۹	۶/۷۰**	۴/۰۷**	۲۲۷/۷**
خطا	۳۲	۱/۷۷	۰/۹۱	۵۳/۳۶
ضریب تغییرات (درصد) C.V		۲۴/۸۶	۱۵/۴۹	۱۴/۸۷

ns, * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد

جدول شماره ۵- مقایسه میانگین تأثیر خشکی و نانو لوله‌های کربنی چند دیواره عامل‌دار و غیرعامل‌دار بر صفات فیزیولوژیکی گیاه مریم‌گلی ایرانی

تیماها	محتوی نسبی آب (درصد)	نشت الکترولیت (درصد)	شاخص کلروفیل (SPAD)
تنش خشکی (FC درصد)			
۱۰۰	۶۶/۰۹ ^a	۸۱/۹۳ ^a	۴۱/۵۳ ^{ab}
۷۵	۶۲/۹۶ ^a	۸۹/۳۸ ^a	۳۹/۶ ^b
۵۰	۵۰/۴۱ ^{ab}	۶۸/۵۲ ^a	۴۰/۴۶ ^{ab}
۲۵	۴۰/۹۴ ^b	۷۸/۸ ^a	۴۴/۸ ^a
نانولوله‌های کربنی چند دیواره (mg/L)			
۰	۶۶/۰۹ ^a	۸۱/۹۳ ^a	۴۱/۵۳ ^a
۵۰ عامل‌دار	۶۰/۸۸ ^a	۶۷/۱۹ ^{ab}	۴۰/۹۳ ^a
۲۰۰ عامل‌دار	۵۹/۸۷ ^a	۴۷/۴۸ ^{ab}	۴۳/۱ ^a
۵۰ غیر عامل‌دار	۵۷/۲ ^a	۴۱/۳۶ ^b	۴۳/۳۳ ^a

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشند.

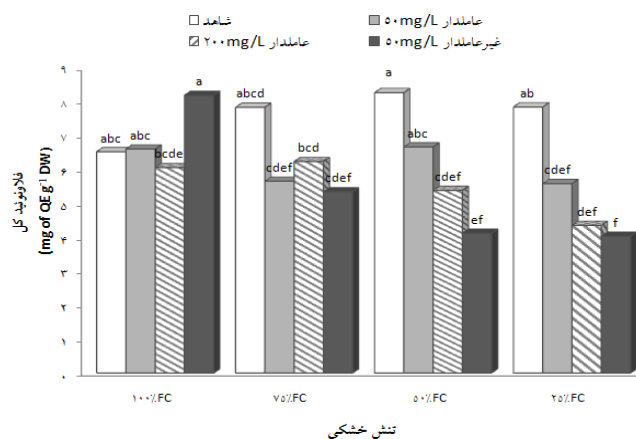


شکل شماره ۳- اثر متقابل سطوح مختلف تنش خشکی (FC درصد) و نانو لوله‌های کربنی چند دیواره بر میزان ترکیبات فنولی. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

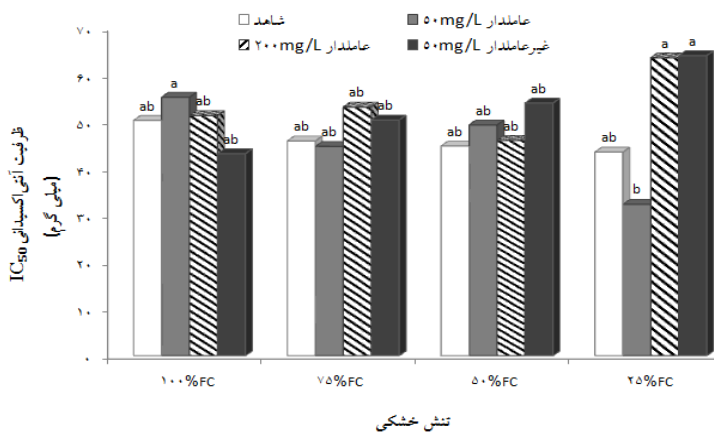
فعالیت آنتی‌اکسیدانی

نتایج نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه مریم‌گلی ایرانی حاصل از تیمارهای مختلف آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر مهار رادیکال‌های آزاد DPPH داشت. بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به عصاره حاصل از گیاهان تحت تیمار همزمان نانولوله‌های کربنی چند دیواره با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و سطح خشکی ۲۵ درصد ظرفیت زراعی بود (شکل شماره ۵).

کربنی نیز اختلاف‌ها معنی‌دار بود ($P < 0/01$) و بیشترین میزان فلاونوئید کل در تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌های غیرعاملدار مشاهده شد. همچنین اثر متقابل این دو تیمار بر محتوای فلاونوئید گیاه مریم‌گلی ایرانی در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود به طوری‌که تیمار برتر در رابطه با این صفت، تیمار ۵۰ درصد ظرفیت زراعی و عدم کاربرد نانولوله‌های کربنی چند دیواره بود و کمترین میزان فلاونوئید از تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌های غیرعاملدار تحت تنش خشکی ۲۵ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد (شکل شماره ۴).



شکل شماره ۴- اثر متقابل سطوح مختلف تنش خشکی (FC درصد) و نانولوله‌های کربنی چند دیواره بر میزان فلاونوئید کل. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.



شکل شماره ۵- اثر متقابل سطوح مختلف تنش خشکی (FC درصد) و نانولوله‌های کربنی چند دیواره بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.



گیاهان دارویی و معطر از قبیل انیسون، خلنگ و مرزه گزارش شده است [۳۶، ۳۵].

یکی از اولین ساختارهای سلول گیاهی که در شرایط تنشهای محیطی آسیب می‌بیند لیپیدهای غشای سلول (غشای پلاسمایی) است [۳۷]. زیرا در نتیجه افزایش برخی ترکیبات فعال اکسیژن از قبیل رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل، غشای سلولی در گیاهان تحت تنش آسیب می‌بیند و الکترولیت‌ها به بیرون از سلول تراوش می‌کند و این باعث می‌شود که لایه درون سلول بار منفی پیدا کند [۳۸]. افزایش این ترکیبات به بسیاری از ساختارها و اجزای سلول نظیر چربی‌ها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای نوکلئیک صدمه می‌زند و با تغییر ساختار غشا در اثر پراکسیداسیون چربی‌ها و پروتئین‌ها [۳۷]، تراوایی غشای سلولی را افزایش می‌دهند که منجر به نشت الکترولیت‌های موجود در داخل سلول به سمت بیرون می‌شود [۳۸] و در نتیجه رشد گیاه تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در مطالعه حاضر، با کاربرد نانولوله‌های کربنی چند دیواره میزان نشت یونی نسبت به گروه شاهد کمتر شد به طوری که کاربرد نانولوله‌ها تأثیر مثبت و بهبوددهنده‌ای در کاهش میزان نشت مواد محلول از غشاء داشت. کاهش خسارت به غشاء در استفاده از نانولوله‌های کربنی چند دیواره را می‌توان به عنوان راهکاری برای افزایش مقاومت به خشکی در گیاهان دانست که ممکن است با تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی برای کاهش خسارت تنش اکسیداتیو همراه باشد. نتایج مطالعه حاضر با گزارش محمدی و همکاران (۲۰۱۴) در کاهش محتوای پراکسید هیدروژن و نشت الکترولیت‌ها روی گیاه نخود تحت تنش سرما با استفاده از نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2) مطابقت دارد [۳۹].

نتایج متفاوتی در رابطه با تأثیر تنش کمبود آب بر غلظت کلروفیل در گیاهان مختلف گزارش شده است. به طور کلی، حفظ غلظت کلروفیل و دوام فتوسنتز در شرایط تنش کمبود آب یکی از شاخص‌های فیزیولوژیکی تحمل خشکی است [۴۰]. بر اساس نتایج احمدی و همکاران (۲۰۱۵) شاخص کلروفیل (SPAD) در گیاه پنیرک (*Malva sylvestris*) تحت

در مطالعه حاضر، با افزایش شدت تنش خشکی از محتوای نسبی آب برگ کاسته شد. گزارش شده است که از بارزترین علائم فیزیولوژیکی کمبود رطوبت خاک، کاهش محتوای نسبی آب برگ‌ها می‌باشد [۲۶]. به طوری که با افزایش شدت تنش خشکی، شرایط جذب آب برای گیاهان مشکل‌تر شده و در نتیجه مقدار آب موجود در یاخته‌های گیاهی کاهش می‌یابد، و کاهش محتوای نسبی آب باعث تأثیر منفی بر تقسیم یاخته‌ای و رشد و نمو گیاه می‌شود [۲۷]. بسیاری از محققان معتقدند که کاهش میزان محتوای رطوبت نسبی برگ در اثر تنش خشکی مربوط به انسداد روزنه‌ها می‌باشد و علت انسداد روزنه‌ها را تجمع هورمون آبسزیک اسید می‌دانند، به طوری که این هورمون در شرایط تنش خشکی در ریشه ساخته شده و در سلول‌های روزنه‌ای تجمع می‌یابد [۲۸]. برخی مطالعات، محتوای نسبی آب برگ را به عنوان یک شاخص قابل اطمینان تحمل به خشکی در گیاهان معرفی می‌کنند [۲۹]. رهبریان و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که با افزایش شدت تنش آبی، میزان محتوای آب نسبی برگ کاهش می‌یابد [۳۰]. تارومینکنگ و کوتو (۲۰۰۳) دلایل کاهش محتوای نسبی برگ را تأخیر در رشد ریشه و فعالیت آن و همچنین افزایش میزان تبخیر و تعرق بیان نمودند [۳۱]. در تحقیق دیگری مونر و همکاران (۱۹۹۹) اثر حفاظتی توکوفرول را در گیاهان رزماری و بادرنجبویه بررسی کرده و نتیجه گرفتند که تنش خشکی، محتوای نسبی آب برگ در بادرنجبویه و رزماری و را به ترتیب تا ۳۰ و ۴۰ درصد کاهش داد [۳۲]. مون و آلرگ (۱۹۹۹) با بررسی اثر شبنم و تنش خشکی بر روی بادرنجبویه گزارش کردند که تنش خشکی موجب کاهش ۳ مگاپاسکالی پتانسیل آب گیاه، کاهش ۳۴ درصدی محتوای آب برگ، بسته شدن روزنه‌ها، کاهش جذب دی‌اکسیدکربن و در نتیجه کاهش میزان فتوسنتز و عملکرد گیاه شد [۳۳]. بنابراین کاهش محتوای نسبی آب برگ در اثر تنش رطوبتی، اثرات منفی در سیستم و ساختار فتوسنتزی گیاه به دنبال دارد [۳۴]. نتایج مشابهی از تأثیر خشکی روی وضعیت آبی و عملکرد برخی



متابولیک در گیاه از جمله منجر به القای سنتز فلاونوئیدها برای تعدیل این وضعیت می‌شود. این عمل از طریق آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) صورت می‌گیرد. کاربرد بازدارنده‌های سنتز فنیل آلانین آمونیا لیاز و مهار مسیر بیوسنتز فلاونوئید، باعث افزایش حساسیت گیاه نسبت به تنش می‌شود.

در مطالعه دیگر، گزارش شده است که نانوذرات اکسید مس (CuO) و اکسید روی (ZnO) اثر مثبتی بر محتوای متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات فنولی در گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) داشتند [۴۸]. قربانپور و هادیان (۲۰۱۵) اثرات نانولوله‌های کربنی چند دیواره را روی القا کالوس و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاه مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica*) در شرایط درون شیشه‌ای بررسی کردند و گزارش کردند که محتوای فلاونوئید، فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با قرار گرفتن در معرض سطوح کم (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) نانولوله‌های کربنی چند دیواره در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت [۴۹]. آنها همچنین بیان کردند که تغییرات در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در تیمار نانولوله‌های کربنی چند دیواره می‌تواند مرتبط با فعالیت آنزیم‌های مختلف مانند فنیل آلانین آمونیا لیاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز باشد. مکانیسم اثر نانولوله‌های کربنی چند دیواره به عنوان الیستور در تولید متابولیت‌های ثانویه و آنتی‌اکسیدان به صورت شماتیکی در شکل شماره ۶ نشان داده شده است [۴۹].

در مطالعه دیگر، قربانپور (۲۰۱۵) گزارش کرد که کاربرد نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2) در گیاه مریم گلی (*Salvia officinalis* L.) باعث افزایش محتوای فنل و فلاونوئید کل شد. به طوری که غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از این نانوذره فعالیت آنتی‌اکسیدانی (IC_{50}) بیشتری در مقایسه با سایر غلظت‌ها نشان داد [۵۰]. به طور کلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی رابطه مستقیم دارد. به عنوان مثال، عصاره نعنای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی زیادی دارد که می‌تواند دلیلی بر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره باشد [۵۲، ۵۱]. با توجه به بررسی‌های انجام شده در منابع، تاکنون هیچ مطالعه‌ای در رابطه با اثر نانولوله‌های کربنی بر کمیت و کیفیت عصاره گیاهان دارویی و

تنش خشکی ابتدا کاهش ولی با افزایش سطح تنش، افزایش یافت [۲۷]. همچنین، گزارش شده است که با بروز تنش خشکی شاخص کلروفیل در گندم زمستانه افزایش یافت که احتمالاً به علت کاهش سطح برگ و تجمع کلروفیل در سطح کمتر باشد [۴۲، ۴۱]. در رابطه با محتوای کلروفیل و کاروتنوئید نیز نتایج مطالعه حاضر با گزارشی در رابطه با کاربرد همزمان نانو اکسید سلیسیوم (SiO_2) و تنش خشکی در گیاه زالزالک (*Crataegus sp.*) که بر محتوای کلروفیل و کاروتنوئید تأثیر معنی‌داری نداشت، مطابقت دارد [۴۳].

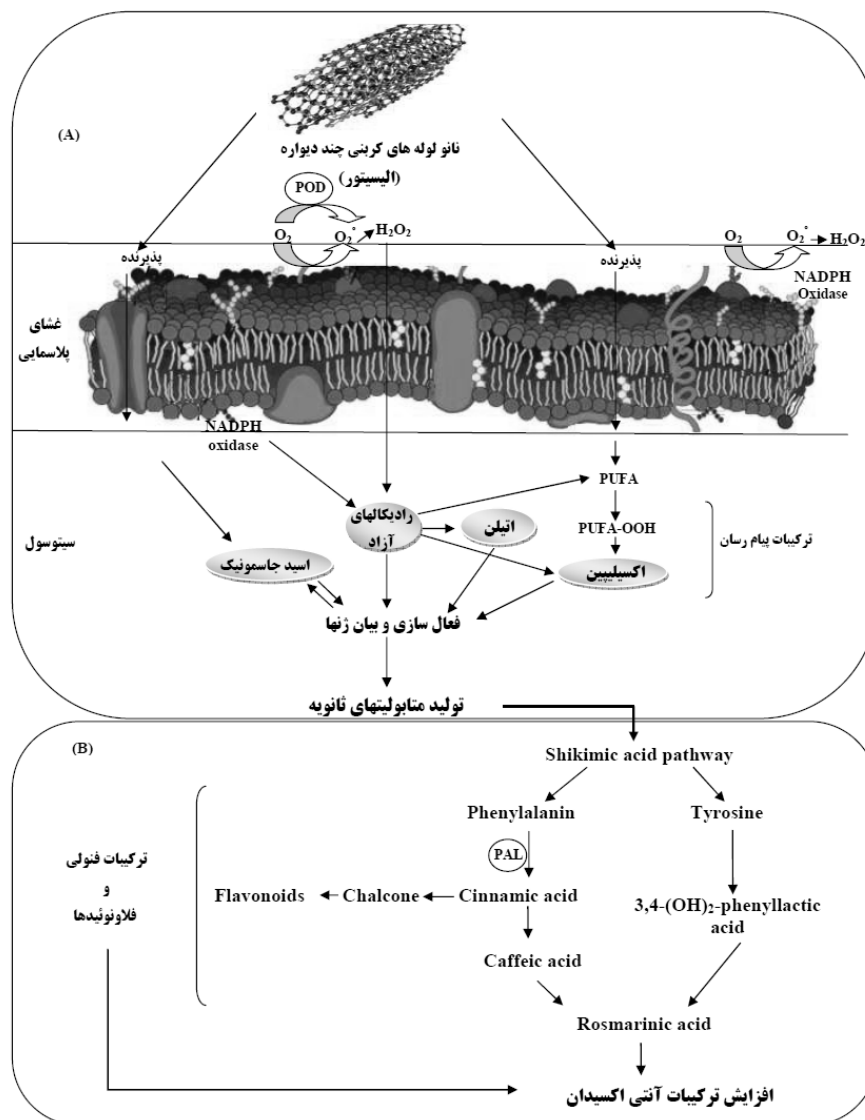
گزارش شده است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان به میزان هر یک از ترکیبات پلی‌فنلی آنها بستگی دارد [۴۴]. تجمع ترکیبات فنلی در گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی متعددی مانند اشعه ماورای بنفش، دمای کم، کاهش تغذیه، حمله پاتوژن‌ها و خشکی صورت می‌گیرد [۴۵]. ترکیبات فنلی به عنوان یکی از مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شناخته شده‌اند که مکانیسم‌های متعددی مثل جاروب کردن رادیکال‌های آزاد و قطع کردن واکنش‌های زنجیره‌وار اکسیداسیون، اهدای هیدروژن، حذف اکسیژن یکتایی، کلات کردن یون‌های فلزی و یا قرار گرفتن به عنوان سوبسترای آنزیم‌های پراکسیداز نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند. این ترکیبات همچنین با اهدای سریع هیدروژن به رادیکال‌های لیپید از ادامه زنجیره پراکسیداسیون ممانعت می‌کنند و قادرند محصولاتی با قدرت اکسیدکنندگی کمتر از ترکیب‌های اولیه به وجود آورند [۴۶]. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که ترکیبات فنلی می‌توانند مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج شده از گیاهان در تیمارهای مختلف باشند.

گزارش شده است که تولید فلاونوئیدها در گیاه انیسون (*Pimpinella anisum* L.) با افزایش تنش خشکی افزایش می‌یابد [۴۷]. در مطالعه حاضر، افزایش فلاونوئید کل در اثر خشکی ممکن است بیانگر این باشد که مریم‌گلی ایرانی برای مقابله با اثرات آسیب‌رسان خشکی، به مقادیر زیادی از فلاونوئیدها وابسته است. یکی از دلایل افزایش میزان فلاونوئیدها در شرایط تنش، ایجاد محدودیت در انتقال الکترون فتوسنتزی طی تنش است که سبب ایجاد تغییرات



گونه‌های اکسیژن فعال وارد عمل می‌شود. درجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها در گیاهان به گونه گیاهی، مرحله نموی، شرایط متابولیک، طول مدت و شدت تنش بستگی دارد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها تحت شرایط تنش خشکی برای مقایسه با نتایج این تحقیق گزارش نشده است. لیکن، دفاع آنتی‌اکسیدانی برای محافظت از یاخته‌ها و آسیب به پروتئین‌ها و تخریب آنزیم‌ها، RNA و DNA در برابر تأثیرات خطرناک



شکل شماره ۶- مکانیسم اثر الیستورها در گیاهان و تولید متابولیت‌های ثانویه. پاسخ فوق حساسیتی گیاه یا سلول بر اساس برهمکنش الیستور-گیرنده به شرح زیر خلاصه می‌شود: اتصال الیستور به پذیرنده غشا پلاسمایی، القای جریان خروجی یون‌های کلر و پتاسیم، تغییرات سریع در الگوی فسفریلاسیون پروتئین، فعال شدن پروتئین کیناز، و G- پروتئین، اسیدی شدن سیتوپلاسم، فعال شدن NADPH اکسیداز مسئول تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، تولید جاسمونات و اسید سالیسیلیک به عنوان پیام برهای ثانویه، فعال شدن آنزیم‌های دفاعی مانند فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) و چالکون سنتاز، تولید مولکول‌های دفاعی مانند فیتوالکسین‌ها و در نهایت متابولیت‌های ثانویه [۴۹].



نتیجه‌گیری

میلی‌گرم در لیتر و تنش خشکی ۲۵ درصد ظرفیت زراعی حاصل شد. استفاده از غلظت کم (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) نانولوله‌های کربنی چند دیواره عاملدار به همراه تنش متوسط خشکی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) شاخص‌های فیزیولوژیکی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه مریم گلی ایرانی را بهبود بخشید.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه اراک به خاطر حمایت در اجرای این تحقیق (در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد) تقدیر و تشکر می‌شود.

نتایج این تحقیق نشان داد که اعمال تنش خشکی و تیمار نانولوله‌های کربنی چند دیواره و اثر متقابل آنها تأثیر معنی‌داری بر برخی صفات فیزیولوژیکی و متابولیتی گیاه مریم گلی ایرانی داشتند. به طوری که، بیشترین و کم‌ترین مقدار ترکیبات فنلی به ترتیب در تیمار نانولوله‌های کربنی چند دیواره عاملدار با غلظت ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر تحت تنش خشکی ۲۵ درصد ظرفیت زراعی به دست آمد. همچنین، بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی از عصاره گیاهان تحت تیمار همزمان نانولوله‌های کربنی چند دیواره عاملدار با غلظت ۵۰

منابع

1. Soltanipoor MA. Investigation on relationship between ecological factors and natural distribution and density of *Salvia mirzayanii* Rech. & Esfand. medicinal species in Hormozgan province; *Iranian J. Medicinal and Aromatic Plants* 2007; 23 (2): 218-22.
2. Javidnia K, Miri R, Kamalinejad M and Nasiri A. Composition of Essential oil of *Salvia mirzayanii* from Iran. *J. Flavour and Fragrance* 2002; 17: 465-76.
3. Wollen weber E, Dorr M, Rustaiyan A, Roitman J and Graven E. Exudate Flavonoids of some *Salvia* and a *Trichostema* Species. *Phytochemistry* 1992; 47: 782 - 4.
4. Hatami M, Hadian J and Ghorbanpour M. Mechanisms underlying toxicity and stimulatory role of single-walled carbon nanotubes in *Hyoscyamus niger* during drought stress simulated by polyethylene glycol. *Journal of Hazardous Materials* 2017; 324: 306 - 20.
5. Seghatoleslami MJ, Feizi H, Mousavi G and Berahmand, A. Effect of magnetic field and silver nanoparticles on yield and water use efficiency of *Carum copticum* under water stress conditions. *Polish Journal of Chemical Technol.* 2015; 17: 110-4.
6. Miralles P, Church TL and Harris AT. Toxicity, uptake, and translocation of engineered nanomaterials in vascular plants. *Environ. Sci. Technol.* 2012; 46: 9224-39.
7. Turkan I, Bor M, Ozdemir F and Koca H. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought tolerant *P.acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science* 2005; 168: 223-31.
8. Mascher R, Nagy E, Lippmann B, Hornlein S, Fischer S, Scheiding W, Neagoe A and Bergmann H. Improvement of tolerance to paraquat and drought in barley (*Hordeum vulgare* L.) by exogenous 2-aminoethanol: effects on superoxide dismutase activity and chloroplast ultrastructure. *J. Plant Science* 2005; 168: 691-8.
9. Baher Nik Z, Mirza M, Abbaszadeh B and Naderi Hajy Bagher Candy M. The effect of metabolism in response to water stress in *Parthenium argentatum* Gray. *Iranian J. Medicinal and Aromatic Plants* 2007; 23: 315-22.
10. Galavi M, Por Mousavi M, Danshiyan J, Ghanbari A and Basirani N. Effects of drought stress and manure on leaf relative water content,



cell membrane stability and leaf chlorophyll content in soybean (*Glycine max*). *J. Agric. Sci. Natur. Resour.* 2007; 14: 4.

11. Opara L U. Emerging technological innovation triad for smart agriculture in the 21st century. Part I. Prospects and impacts of nanotechnology in agriculture. *The CIGR J. Scientific Research and Development* 2004; 2 (6): 56 - 66.

12. Hatami M, Kariman K and Ghorbanpour M. Engineered nanomaterial-mediated changes in the metabolism of terrestrial plants. *Science of the Total Environment* 2016; 571: 275 - 91.

13. Ghorbanpour M and Hatami H. Changes in growth, antioxidant defense system and major essential oils constituents of *Pelargonium graveolens* plant exposed to nanoscale silver and thidiazuron. *Ind. J. Plant Physiol.* 2015; 20: 116 - 23.

14. Ghorbanpour M and Hatami M. Spray treatment with silver nanoparticles plus thidiazuron increases antioxidant enzyme activities and reduces petal and leaf abscission in four cultivars of Geranium (*Pelargonium zonale*) during storage in the dark. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 2014; 89: 712 - 8.

15. Hatami M and Ghorbanpour M. Defense enzyme activities and biochemical variations of *Pelargonium zonale* in response to nanosilver application and dark storage. *Turkish Journal of Biol.* 2014; 38: 130 - 9.

16. Khodakovskaya M, Kim B, Kim J, Alimohammadi M, Dervishi E, Mustafa T and Cernigla C. Carbon Nanotubes as Plant Growth Regulators: Effects on Tomato Growth, Reproductive System, and Soil Microbial Community. *Small.* 2013; 9: 115 - 23.

17. Kiapour H, Moaveni P, Habibi D and Sani B. Evaluation of the application of gibberellic acid and titanium dioxide nanoparticles under drought stress on some traits of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Int. J. Agron. Agric. Res.* 2015; 6: 138 - 50.

18. Zareii FD, Roozbahani A and Hosnamidi A. Evaluation the effect of water stress and foliar

application of Fe nanoparticles on yield, yield components and oil percentage of safflower (*Carthamus tinctorious* L.). *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.* 2014; 2: 1150 - 9.

19. Aghdam MTB, Mohammadi H, Ghorbanpour M. Effects of nanoparticulate anatase titanium dioxide on physiological and biochemical performance of *Linum usitatissimum* (Linaceae) under well-watered and drought stress conditions. 2016; 39, (1), 139-146.

20. Ferrat IL and Lova CJ. Relation between relative water content, Nitrogen pools and growth of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius*, A. Gray during water deficit. *Crop Science* 1999; 39: 467 - 74.

21. Karlidag H, Yildirim E and Turan M. Salicylic acid ameliorates the adverse effect of salt stress on strawberry. *Science Agriculture* 2009; 66 (2): 180-7.

22. Arnon D. Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 1949; 24: 1-15.

23. Lamaison JL, Carnat A. Content of principal flavonoids of the flowers and leaves of *Crataegus monogyna* Jacq. And *Crataegus laevigata* (Poiret) DC. (Rosaceae). *Pharm. Acta Helv.* 1990; 65: 315 - 20.

24. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 1965; 16: 144 - 53.

25. Burits M and Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Res.* 2000; 14: 323 - 8.

26. Nautiyal PC, Rachaputi NR and Joshi YC. Moisture-deficit-induced changes in leaf-water content, leaf carbon exchange rate and biomass production in groundnut cultivars differing in specific leaf area. *Field Crop Res.* 2002; 74: 67-79.

27. Ahmadi Azar F, Hasanloo T, Imani A and Feiziasl V. Water stress and mineral zeolite application on growth and some physiological characteristics of Mallow (*Malva sylvestris*).



- Iranian J. Biol.* 2015; 28: 459 - 74.
28. Liu X and Huang B. Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. *Crop Science Society of America* 2000; 40 (2): 503 - 10.
29. Sinclair T R and Ludlow MM. Who thought plant thermodynamics? The unfulfilled potential of plant water potential. *Australia. J. Plant Physiol.* 1985; 33: 312 - 7.
30. Rahbarian P, Afsharmaneshb G and Shirzadic MH. Effects of drought stress and manure on relative water content and cell membrane stability in dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.), *Plant Ecophysiol.* 2010; 2: 13 - 9.
31. Tarumingkeng RC and Coto Z. Effects of drought stress on growth and yield of soybean. Kisman, *Science Philosophy Agricultural University* 2003, pp: 702.
32. Munne S, Schwarz K, Alegre L, Horvath G and Szigeti Z. Alpha-tocopherol protection against drought, induced damage in *Rosmarinus officinalis* L and *Melissa officinalis* L. proceedings of an International workshop at Tata. *Hungary* 1999; 23-6.
33. Munne S and Alegre L. Role of dew on the recovery of water stressed *Melissa officinallis* L. *J. Plant Physiol.* 1999; 154 (5-6): 759 - 66.
34. Siddique MRB, Hamid A and Islam MS. Drought stress effects on water relations of wheat. *Bat. Bull. Acad. Sin.* 2000; 41: 35 - 9.
35. Gratani L and Varone L. Leaf key traits of *Erica arborea* L., *Erica multifolia* L. and *Rosmarinus officinalis* L. Co-occurring in Mediteranean maquis. *Flora* 2004; 199: 58-69.
36. Heidari N, Pouryousef M and Tavakoli A. Effects of drought stress on photosynthesis, its parameters and relative water content of anise (*Pimpinella anisum* L.). *Iranian J. Biol.* 2014; 27: 829-39.
37. Liang Y, Chen Q, Liu W, Zhang and Ding R. Exogenous silicone (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid per oxidation in roots or salt- stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Plant Physiol.* 2003; 99: 872-8.
38. Blume A and Ebercon A. 1981. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sci.* 1981; 27 (1): 43 - 7.
39. Mohammadi R, MaaliAmiri R, Mantri N. Effect of TiO₂ nanoparticles on oxidative damage and antioxidant defense systems in chickpea seedlings during cold stress. *Russ. J. Plant Physiol.* 2014; 61: 768-75.
40. Pessarakli M. Hand book of plant and crop stress. Marcel Dekker Inc. 1999, pp: 697.
41. Barraclough PB and Kate J. Effect of water stress on chlorophyll meter reading in wheat. *Plant Nutrition* 2001; 44: 722- 3.
42. Ommen OE and Donnelly A. Chlorophyll content of spring wheat flag leaves grown under elevated CO₂ concentrations and other environmental stresses within the ESPACE- wheat project. *European J of Agronomy* 1999; 10: 197 -203.
43. Ashkavand P, Tabari M, Zarafshar M, Tom_a_skov_a I and Struve D. Effect of SiO₂ nanoparticles on drought resistance in hawthorn seedlings. *Le_sne Prace Badawcze* 2015; 76: 350-9.
44. Wiseman H and Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role of inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 1996; 313: 17 - 29.
45. Yamasaki H, Sakihama Y and Ikehara N. 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Phytologist* 1997; 115 (4): 1405 - 12.
46. Chu YH, Chang CL and Hsu HF. Flavonoid content of several vegetable and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000; 80 (5): 561-6.
47. Asadi Kavan Zh, Ghorbanli M and Sateei A. The effect of drought stress and exogenous ascorbate on photosynthetic pigments, flavonoids, phenol compounds and lipid peroxidation in *Pimpinella anisum* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 2010; 25 (4): 456-69.



48. Oloumi H, Soltaninejad R and Baghizadeh A. The comparative effects of nano and bulk size particles of CuO and ZnO on glycyrrhizin and phenolic compounds contents in *Glycyrrhiza glabra* L. seedlings. *Indian Journal of Plant Physiol.* 2015; 20: 157 - 61.
49. Ghorbanpour M, Hadian, J. Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown in vitro. *Carbon* 94, 2015; 94: 749 - 59.
50. Ghorbanpour M. Major essential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* plant in response to nano-titanium dioxide. *Indian J. Plant Physiol.* 2015; 20 (3), 249 - 56.
51. Swetie R, Raesh Ch, Arun S. Antioxidant potential of mint (*Mentha Spicata* L.) in radiationprocessed lamb meat. *Food Chem.* 2007; 100 (2): 451-8.
52. Ghorbanpour M, Hatami M, Kariman K and Abbaszadeh Dahaji P. Phytochemical Variations and Enhanced Efficiency of Antioxidant and Antimicrobial Ingredients in *Salvia officinalis* as Inoculated with Different Rhizobacteria. *Chemistry and Biodiversity* 2016; 13 (3): 319 - 30.



Effect of Multi-Walled Carbon Nanotubes on Physiological Traits, Phenolic Contents and Antioxidant Capacity of *Salvia mirzayanii* Rech. f. & Esfand. under Drought Stress

Chegini E (M.Sc. Student)¹, Ghorbanpour M (Ph.D.)^{2*}, Hatami M (Ph.D.)², Taghizadeh M (Ph.D.)³

1- MS.c. Student of Medicinal Plants, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran

2- Department of Medicinal Plants, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran

3- Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran

*Corresponding author: Department of Medicinal Plants, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, 38156-8-8349, Iran

Tel: +98- 911- 3927299, Fax: +98-8632761007

Email: m_ghorbanpour@yahoo.com

Abstract

Background: Environmental stresses and biotic and abiotic elicitors induce secondary metabolites biosynthesis and hypersensitive response in plants through activation of defense mechanisms.

Objective: This study was carried out with the aim of assessing the effects of different drought stress and multi-walled carbon nanotube (MWCNT) levels on physiological variations, flavonoid and phenolic contents, and antioxidant capacity of *Salvia mirzayanii*.

Methods: This study was arranged in a factorial experiment based on randomized complete block design under research greenhouse of medicinal plants department at Arak University. The first factor was considered as drought stress in 4 levels (25, 50, 75 and 100% of field capacity), and the second factor was designated as foliar spray of MWCNT (functionalized and non- functionalized) at 4 different concentrations (0, 50 and 200 mg/L).

Results: Results showed that drought stress and MWCNT and their interactions significantly affected some studied traits. Leaf relative water content ($P<0.01$) and chlorophyll index ($P<0.05$) was significantly changed under drought stress treatment, however, electrolyte leakage index significantly ($P<0.01$) affected under different levels of MWCNT. Furthermore, total phenolics was significantly ($P<0.01$) changed under interaction of experimental treatments. The highest and the lowest phenolics content were achieved in functionalized MWCNT exposed plants at 50 and 200 mg/L under 25% of FC, respectively.

Conclusion: Application of functionalized MWCNT at concentration of 50 mg/L along with moderate drought stress improved physiological traits and antioxidant activity of extract in *S. mirzayanii* plants.

Keywords: *Salvia mirzayanii*, Antioxidant activity, Leaf relative water content, Multi-walled carbon nanotube, Total phenol, Water deficit stress

